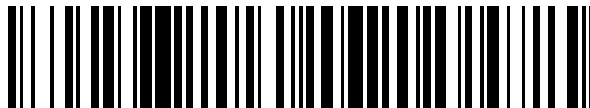


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 122**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2013 PCT/IB2013/059827**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068519**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2013 E 13828810 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2914747**

54 Título: **Método y kit para detectar una secuencia de ADN diana de tipo salvaje y/o mutada**

30 Prioridad:

**31.10.2012 IT TO20120962**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**27.06.2018**

73 Titular/es:

**MENARINI SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)  
Via G. di Vittorio, 21 B/3  
40013 Castel Maggiore (BO), IT**

72 Inventor/es:

**FONTANA, FRANCESCA y  
MANARESI, NICOLO**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 674 122 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método y kit para detectar una secuencia de ADN diana de tipo salvaje y/o mutada

5 La presente invención se refiere a un método y a un kit para detectar una secuencia de ADN diana tipo salvaje y/o una secuencia de ADN diana mutada, que difieren en que una sustitución o eliminación o inserción de nucleótido única o múltiple genera/elimina un sitio de restricción para una endonucleasa de restricción.

Estado de la técnica

La Amplificación Completa del Genoma en una o pocas células se usa para amplificar el ADN con el fin de permitir diferentes tipos de análisis genéticos, que incluyen la secuenciación y la detección de SNP.

10 La amplificación completa del genoma por medio de una PCR mediada por ligación (LM-PCR) basada en un sitio de restricción determinista (en lo sucesivo denominado DRS-WGA) se conoce a partir del documento EP1109938.

15 Se ha demostrado que DRS-WGA es mejor para la amplificación de células individuales (véase, por ejemplo: Lee YS, et al. Comparison of whole genome amplification methods for further quantitative analysis with microarray-based comparative genomic hybridization. Taiwan J Obstet Gynecol. 2008, 47(1): 32-41) y también más tolerantes a la degradación del ADN debido al tratamiento de fijación (véase, por ejemplo: Stoecklein N.H. et al.: SCOMP is Superior to Degenerated Oligonucleotide Primed-PCR for Global Amplification of Minute Amounts of DNA from Microdissected Archival Samples American Journal of Pathology 2002, Vol. 161, No. 1; Arneson N. et al.: Comparison of Whole Genome Amplification methods for analysis of DNA extracted from microdissected early breast lesions in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. ISRN Oncol. 2012; 2012; 710692).

20 Las bibliotecas de ADN DRS-WGA comprenden fragmentos de ADN con la estructura general mostrada en la Figura 1A. La Figura 1B muestra un ejemplo específico de la estructura de los fragmentos de la biblioteca de ADN obtenidos mediante DRS-WGA usando la endonucleasa de restricción MseI.

25 Los ensayos de detección de mutaciones corriente abajo de DRS-WGA se llevan a cabo normalmente diseñando cebadores dentro del amplicón de endonucleasa de restricción (RE). Aunque DRS-WGA proporciona mejores resultados en términos de amplificación uniforme y equilibrada, el diseño de ensayos para determinar la presencia de mutaciones puede ser desafiante en circunstancias en las que la mutación en cuestión genera o elimina un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción DRS-WGA dentro del amplicón de RE, porque la forma habitual de diseñar cebadores dentro del amplicón de RE no permite distinguir el ADN de tipo salvaje y el mutado.

30 A modo de explicación, a continuación, se muestran ejemplos de mutaciones que dan lugar al problema mencionado anteriormente para el sitio de restricción TTAA de la endonucleasa de restricción MseI, sin embargo, los mismos problemas ocurren con cualquier otro sitio de restricción. Los siguientes ejemplos no deben considerarse como limitativos de la presente invención, ya que pueden aplicarse también a otros métodos para DRS-WGA, que incluyen métodos que usan una endonucleasa de restricción que produce fragmentos de ADN de extremo romo.

Caso A. Una mutación introduce un nuevo sitio de restricción (RS). Sustitución

35 Una sustitución es una mutación de ADN en la que uno (o más) nucleótidos se reemplaza incorrectamente por un nucleótido diferente. Esto genera un cambio en la secuencia de nucleótidos del sitio de ADN particular.

La sustitución puede por lo tanto introducir un RS en la secuencia de ADN mutada (M) en donde no estaba presente RS en la secuencia de ADN de tipo salvaje (WT).

Como ejemplo para una única sustitución de bases:

Secuencia WT	Secuencia M	Caso
VTAA	TTAA	(1)
TVAA	TTAA	(2)
TTBA	TTAA	(3)
TTAB	TTAA	(4)

en donde V es A o C o G (no T), y B es C o G o T (no A).

Eliminación

Una mutación de ADN puede eliminar uno (o más) nucleótidos que producen un RS en la secuencia de ADN mutada (M) en la que no estaba presente un RS en la secuencia de ADN de tipo salvaje (WT).

- 5 Por ejemplo para eliminaciones de bases únicas o múltiples (n):

Secuencia WT	Secuencia M	Caso
T[V] <sub>n</sub> TAA	TTAA	(5)
TT[V] <sub>n</sub> AA	TTAA	(6)
TT[B] <sub>n</sub> AA	TTAA	(7)
TTA[B] <sub>n</sub> A	TTAA	(8)

Inserción

Una mutación de ADN puede insertar uno (o más) nucleótidos que producen un RS en la secuencia de ADN mutada (M) en la que no estaba presente un RS en la secuencia de ADN de tipo salvaje (WT).

- 10 Por ejemplo para una inserción de base única:

Secuencia WT	Secuencia M	Caso
VTAA	[insT]TAA	(9)
TTAB	TT[insA]AB	(10)

y los casos indistinguibles relacionados de:

VTAA	T[insT]AA	(9')
TTAB	TTA[insA]B	(10')

- 15 Todas las mutaciones anteriores introducen un RS, lo que da como resultado que la mutación no sea detectable en el fragmento de la biblioteca de ADN, por ejemplo mediante PCR y secuenciación, cuando se usan pares de cebadores que amplifican una región que comprende el sitio de mutación, ya que solo el alelo de tipo salvaje (si está presente) se amplificará y secuenciará correctamente. Esta situación se describe en la Figura 2, Caso A, recuadro izquierdo.

Caso B. La mutación elimina el sitio de restricción de la secuencia de tipo salvaje (WT)

Sustitución

- 20 Una sustitución puede eliminar el RS presente en la secuencia de ADN WT.

## ES 2 674 122 T3

Secuencia WT	Secuencia M	Caso
TTAA	VTAA	(11)
TTAA	TVAA	(12)
TTAA	TTBA	(13)
TTAA	TTAB	(14)

Lo anterior corresponde a los casos (1)-(4) en los que se intercambian la secuencia de ADN M y la secuencia de ADN de WT.

### Eliminación

- 5 Una mutación de ADN puede eliminar uno (o más) nucleótidos eliminando un RS en donde un RS estaba presente en la secuencia de ADN de tipo salvaje (WT).

Por ejemplo para eliminaciones de base única:

Secuencia WT	Secuencia M	Caso
VTTAA	V[delT]TAA	(15)
TTAAB	TT[delA]AB	(16)

y los casos indistinguibles relacionados de:

VTTAA	VT[delT]AA	(15')
TTAAB	TTA[delA]B	(16')

### 10 Inserción

Una mutación de ADN puede insertar uno (o más) nucleótidos eliminando un RS en donde un RS estaba presente en la secuencia de ADN de tipo salvaje (WT).

Secuencia WT	Secuencia M	Caso
TTAA	T[insV] <sub>n</sub> TAA	(17)
TTAA	TT[insV] <sub>n</sub> AA	(18)
TTAA	TT[insB] <sub>n</sub> AA	(19)
TTAA	TTA[insB] <sub>n</sub> A	(20)

Cualquiera (y muchos otros) casos que comprenden la eliminación de una o más bases como en el ejemplo anterior, eliminarán el RS existente en una secuencia WT, dando como resultado una secuencia no digerida.

5 Aunque la secuencia mutada puede identificarse fácilmente diseñando pares de cebadores que amplifican la secuencia de ADN que comprende el sitio de mutación, el alelo de tipo salvaje (si está presente) no puede amplificarse, dando una evaluación incorrecta del genotipo. Esta situación se describe en la Figura 2, Caso B, recuadro derecho.

Además, cuando no hay mutación, no habría señal en absoluto a partir de la PCR, y sería imposible determinar si hubo un abandono del alelo tipo salvaje durante DRS-WGA o si el genotipo es simplemente de tipo salvaje.

10 El documento EP1350853 describe la técnica de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) que revela polimorfismos en sitios de restricción. El método para detectar polimorfismos de secuencia entre uno o más genomas comprende producir una huella digital de ácido nucleico a partir de dichos genomas mediante (a) proporcionar a partir de un ácido nucleico inicial una pluralidad de fragmentos de ácido nucleico ligables adaptables con extremos que son compatibles con al menos un adaptador, y en donde dichos fragmentos de ácido nucleico se obtienen por fragmentación con endonucleasas de restricción; (b) realizar una reacción de ligación entre dichos extremos de dichos fragmentos de ácido nucleico y dicho al menos un adaptador para producir fragmentos de ácido nucleico ligados a un adaptador; (c) amplificar dichos fragmentos de ácido nucleico ligados a adaptador usando al menos un cebador de amplificación esencialmente complementario a la secuencia de nucleótidos de dicho al menos un adaptador; y (d) generar a partir de dichos fragmentos de ácido nucleico ligados con adaptador amplificados una huella digital de ácido nucleico; comparar las huellas digitales de ácido nucleico obtenidas con la presencia o ausencia de, o diferencias entre, fragmentos amplificados de ácido nucleico para determinar la presencia de polimorfismos de secuencia.

20 Sin embargo, este método no permite la detección de un sitio polimórfico específico.

Quiang Nie et al. describe el análisis de RFLP-PCR para un polimorfismo de EGFR. Esta técnica emplea pares de cebadores específicos para amplificar las regiones de interés, que contienen el polimorfismo, y posteriormente tratan el fragmento amplificado con una endonucleasa de restricción específica.

25 El documento US 6420117 B1 divulga un método para la detección de polimorfismos repetidos debido a elementos transponibles. Este método proporciona una huella digital de ADN y comprende proporcionar una pluralidad de fragmentos de restricción que comprenden adaptadores; amplificar al menos una porción de los fragmentos de restricción con un par de cebadores, en donde la secuencia de nucleótidos de un cebador del par de cebadores es complementaria a una porción de una secuencia de interés, y en la que el otro cebador del par de cebadores comprende en el terminal 5' una secuencia de nucleótidos complementaria a al menos una porción del adaptador; y resolver los fragmentos amplificados para producir una huella digital de ADN.

35 Un objeto de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar un método para detectar una secuencia de ADN diana de tipo salvaje y/o una secuencia de ADN diana mutada en una biblioteca de fragmentos de ADN que tienen una estructura tal como la obtenida por DRS-WGA, en donde la secuencia de ADN diana de tipo salvaje y la secuencia de ADN diana mutada difieren en presencia de un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción del DRS-WGA, que resuelve los problemas citados anteriormente de una manera simple y eficiente.

Este objeto se consigue mediante la presente invención en lo que se refiere a un método como se define en la reivindicación 1.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un kit como se define en la reivindicación 10.

#### Definiciones

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación. A menos que se mencione lo contrario, las técnicas descritas en este documento para uso con la invención son metodologías estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

Mediante el término "sitio de restricción" o "RS" se indica la secuencia de nucleótidos (típicamente 4-8 pares de bases de longitud) a lo largo de una molécula de ADN reconocida por la endonucleasa de restricción (o "RE"). En el sitio de restricción, la endonucleasa de restricción escinde los nucleótidos hidrolizando un enlace fosfodiéster entre ellos.

50 Mediante el término "sitio de restricción dependiente de la mutación" (o "MDRS"), se indica el RS que se introduce o elimina por efecto de la mutación.

Mediante el término "sitio de escisión" (o "CS"), se indica la posición en la secuencia del sitio de restricción en donde se localizan los enlaces fosfodiéster hidrolizados por el RE.

Mediante el término "sitio de escisión dependiente de la mutación" (o "MDCS"), se indica el CS que se introduce o elimina por efecto de la mutación.

Mediante el término "amplicón" se indica una región de ADN producida por amplificación por PCR.

5 Mediante los términos "amplicón DRS-WGA" o "amplicón WGA", se indica un fragmento de ADN amplificado durante DRS-WGA, que comprende una secuencia de ADN entre dos RS flanqueados por los cebadores WGA ligados.

Mediante los términos "cebador WGA PCR" o "cebador WGA universal" o "adaptador", se indica ligar el oligonucleótido adicional a cada fragmento generado por la acción de la enzima de restricción en DRS-WGA.

Mediante el término "ADN original", se indica el ADN genómico (ADNg) antes de la amplificación con DRS-WGA.

Mediante el término "secuencia diana", se indica la región de interés en el ADN original.

10 Mediante el término "cadena de sentido de la secuencia diana" se indica en general el segmento de la cadena de ADN que corre de 5' a 3', que tiene la misma secuencia que el ARNm y es complementario de la cadena antisentido. La cadena de sentido también puede denominarse "cadena positiva".

En aras de la simplicidad, en la presente descripción, el término "cadena positiva de secuencia diana" (TSPS) se usará con los siguientes significados:

15 1. 1) identifica la secuencia de ADN genómico aumentando el número de nucleótidos en el caso en donde la mutación ocurra en el lado 3' del sitio de escisión dependiente de la mutación en la secuencia con el número creciente de nucleótidos

20 2. 2) identifica el complementario reverso de la secuencia de ADN genómico al aumentar el número de nucleótidos en el caso en donde la mutación ocurra en el lado 5' de la posición del sitio de escisión dependiente de la mutación en la secuencia con un número creciente de nucleótidos.

Cohherentemente, la expresión "cadena antipositiva de secuencia diana" (TSAS) se usará en la presente descripción con los siguientes significados:

25 3) identifica el complementario reverso de la secuencia de ADN genómico aumentando el número de nucleótidos en el caso en donde la mutación ocurra en el lado 3' del sitio de escisión dependiente de la mutación en la secuencia con un número creciente de nucleótidos

4) identifica la secuencia de ADN genómico aumentando el número de nucleótidos en el caso en donde la mutación ocurra en el lado 5' de la posición del sitio de escisión dependiente de la mutación en la secuencia con el número de nucleótidos en aumento

30 La expresión "aumento del número de nucleótidos" se refiere a la numeración relativa a la posición del cromosoma (como se encuentra en las bases de datos de secuencias, tales como UCSC Genome Browser).

Mediante la expresión región de extremo "5' de un segmento de secuencia, se pretende que la localización de la secuencia de nucleótidos referida esté hacia el extremo 5' terminal del segmento de secuencia.

Mediante la expresión región de extremo "3' de un segmento de secuencia, se pretende que la localización de la secuencia de nucleótidos referida esté hacia el extremo 3' terminal del segmento de secuencia.

35 Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1A muestra un bosquejo de la estructura general de un fragmento de la biblioteca de ADN obtenido mediante un DRS-WGA específico, usando la endonucleasa de restricción MseI, cuando un sitio de escisión dependiente de la mutación (MDCS) no se escinde. Los acrónimos son los siguientes: FTS = primera secuencia diana; CS = sitio de escisión; RS = sitio de restricción; FTSPS = primera cadena positiva de la secuencia diana; FTSAS = primera cadena antipositiva de la secuencia diana; NUCL # = número de nucleótidos (aumenta según la dirección de la flecha); WT = tipo salvaje; MDCS = sitio de escisión dependiente de la mutación.

45 La Figura 1B muestra un esquema de la estructura general de un fragmento de la biblioteca de ADN obtenido mediante un DRS-WGA específico, usando la endonucleasa de restricción MseI, cuando se escinde un sitio de escisión dependiente de la mutación (MDCS). Acrónimos adicionales son los siguientes: STS = segunda secuencia diana; MDRS = sitio de restricción dependiente de la mutación; M = mutado; STSPS = segunda cadena positiva de secuencia diana; STSAS = segunda cadena antipositiva de la secuencia diana.

- La Figura 1C muestra un boceto de la primera secuencia diana de cadenas positivas y antipositivas y la ubicación de cebadores reversos e inversos relacionados. Acrónimos adicionales son los siguientes: R1 = primer cebador inverso; F2 = segundo cebador de avance.
- 5 La Figura 1D muestra un boceto de la segunda secuencia diana de cadenas positivas y antipositivas y la ubicación de los cebadores reversos e inversos relacionados. Los acrónimos adicionales son los siguientes: F3 = tercer cebador de avance; F31 = primera porción del tercer cebador de avance; F32 = segunda porción del tercer cebador de avance.
- La Figura 1E muestra un boceto de la primera secuencia diana de cadenas positivas y antipositivas y la ubicación de cebadores reversos y de avance relacionados, cuando la mutación está localizada en el lado 5' de la MDCS en la secuencia al aumentar el número de nucleótidos.
- 10 La Figura 1F muestra un boceto de la segunda secuencia diana de cadenas positivas y antipositivas y la ubicación de cebadores reversos y de avance relacionados, cuando la mutación está localizada en el lado 5' de la MDCS en la secuencia aumentando el número de nucleótidos.
- En las Figuras 1A-1F, se hace referencia a la situación en la que la secuencia no escindida es la secuencia WT, y la secuencia escindida es la secuencia mutante. La situación alternativa en la que la secuencia mutada no se escinde y la secuencia de tipo salvaje se escinde se puede obtener fácilmente simplemente intercambiando WT con M.
- 15 La Figura 2 muestra un bosquejo simplificado de las dos situaciones que comprende la introducción (Caso A - recuadro izquierdo) o la eliminación (Caso B) de un sitio de restricción en la secuencia de ADN mutada y las consecuencias con los métodos de detección de mutaciones tradicionales.
- La Figura 3 muestra una imagen de una electroforesis en gel de los productos separados de una amplificación por PCR realizada con un par de cebadores bivalentes para ADN mutado y en peso del Ejemplo 1. Cnt: blanco de la reacción de WGA. C-: blanco de la reacción de PCR.
- 20 Las Figuras 4A y 4B muestran esquemas simplificados del principio de funcionamiento del método de acuerdo con la invención. La Figura 4A muestra la situación en la que la mutación introduce un sitio de restricción en la secuencia. La figura 4B muestra la situación en la que la mutación elimina el sitio de restricción en la secuencia.
- 25 La Figura 5 muestra una imagen de una electroforesis en gel de los productos separados de una amplificación por PCR realizada con un cebador 5' específico mutado que incluye el sitio de restricción, homólogo en un 86% de su longitud al cebador WGA universal.
- La Figura 6 muestra una imagen de una electroforesis en gel de los productos separados de una amplificación por PCR realizada con el cebador 5' específico de tipo salvaje del Ejemplo 3.
- 30 La Figura 7 muestra una imagen de una electroforesis en gel de los productos separados de una amplificación por PCR realizada con el cebador 5' específico mutado del Ejemplo 3.
- La Figura 8 muestra un ejemplo de secuenciación de un alelo tipo salvaje del Ejemplo 3.
- La Figura 9 muestra un ejemplo de secuenciación de un alelo mutado del Ejemplo 3.
- La Figura 10 muestra una tabla que resume los resultados del Ejemplo 4.
- 35 La Figura 11 muestra una imagen de una electroforesis en gel de los productos separados de una amplificación por PCR de células individuales M y WT realizadas con el par de cebadores mutados del Ejemplo 5.
- La Figura 12 muestra una imagen de una electroforesis en gel de los productos separados de una amplificación por PCR de células individuales M y WT realizadas con el par de cebadores de tipo salvaje del Ejemplo 5.
- La Figura 13 muestra un ejemplo de secuencia de cadena inversa de una célula única de tipo salvaje del ejemplo 6.
- 40 La Figura 14 muestra un ejemplo de secuencia de cadena inversa de una sola célula mutada del ejemplo 6.
- La Figura 15 muestra una tabla que resume los resultados del Ejemplo 6.
- La Figura 16 muestra un ejemplo de secuencia de cadena inversa de una célula salvaje (un leucocito) positiva para el producto de PCR mutante (es decir, un falso positivo para el producto de PCR solo), que en cambio se confirmó que era de tipo salvaje mediante el ensayo como en el Ejemplo 6.
- 45 Descripción detallada de la invención

El método de acuerdo con la presente invención para detectar al menos una de al menos una primera secuencia de ADN diana y al menos una segunda secuencia de ADN diana de una biblioteca de secuencias de ADN comprende las etapas (a) a (c). La primera secuencia de ADN diana difiere de la segunda secuencia de ADN diana en que una sustitución o eliminación o inserción de nucleótidos única o múltiple en la segunda secuencia genera un sitio de restricción para una endonucleasa de restricción, dando lugar - si se escinde por la endonucleasa de restricción - a una primera secuencia, segunda diana 3' escindida del sitio de restricción generado y una segunda secuencia, segunda diana 5' escindida del sitio de restricción generado. Con referencia a la figura 2, caso A, recuadro izquierdo, y figura 4A, la primera secuencia de ADN diana corresponde a la secuencia de ADN de tipo salvaje y la segunda secuencia de ADN diana corresponde a la secuencia de ADN mutada, mientras que con referencia a la figura 2, caso B, recuadro derecho, y Figura 4B, la primera secuencia de ADN diana corresponde a la secuencia de ADN mutada y la segunda secuencia de ADN diana corresponde a la secuencia de ADN de tipo salvaje.

En la etapa (a), se proporciona la biblioteca de secuencias de ADN. Cada una de las secuencias de ADN de la biblioteca comprende, respectivamente, desde el extremo 5' hasta el extremo 3', un primer segmento de secuencia que tiene una longitud de 15 a 50 nucleótidos, un segundo segmento de secuencia de ADN genómico escindido por la endonucleasa de restricción, y un tercer segmento de secuencia reverso complementario a la unión del primer segmento de secuencia y, si lo hay, el saliente 5' generado por el RE. Con referencia a la Figura 1A, el número 1 muestra el primer segmento de secuencia, el número 2 muestra el segundo segmento de secuencia, y el número 3 muestra el tercer segmento de secuencia. En una realización preferida, el primer segmento de secuencia corresponde al cebador WGA PCR.

La endonucleasa de restricción es preferiblemente Msel.

En la etapa (b), la biblioteca de secuencias de ADN se amplifica mediante PCR usando:

- al menos un primer cebador reverso que se hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de la al menos una primera cadena positiva de secuencia diana o al menos una primera cadena positiva de secuencia, segunda diana escindida;

- al menos un segundo cebador de avance que se hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de al menos una primera cadena antipositiva de la secuencia diana;

- al menos un tercer cebador de avance que comprende una primera porción 5' que se hibrida con la región del extremo 5' del tercer segmento de secuencia de al menos una primera cadena antipositiva de secuencia segunda diana escindida y una segunda porción 3' hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de al menos una primera cadena antipositiva de secuencia segunda diana escindida, en donde la primera porción del al menos un tercer cebador de avance tiene una longitud de 20% a 80% con respecto a la longitud total de al menos un tercer cebador de avance.

El tercer cebador de avance se denominará a continuación abreviadamente como "cebador híbrido".

Preferiblemente, al menos un cuarto cebador reverso que hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de la al menos una primera cadena positiva de secuencia, segunda diana escindida se usa en la etapa (b).

Preferiblemente, la primera porción del al menos un tercer cebador de avance tiene una longitud de 40 a 60%, con respecto a la longitud total del al menos un tercer cebador de avance.

Preferiblemente, la segunda porción del al menos un tercer cebador de avance tiene una longitud en bases comprendida entre un mínimo correspondiente a la secuencia consenso de la endonucleasa de restricción menos, si hay alguno, el saliente 5' generado por la endonucleasa de restricción, todo dividido por dos y un máximo de 30 bases.

Con referencia a la Figura 4A, el primer cebador reverso corresponde al cebador reverso natural (WT\_R), el segundo cebador de avance corresponde al cebador de avance natural (WT\_F), el tercer cebador de avance corresponde al cebador de avance mutado (M\_F). En una realización, el primer cebador reverso sirve para amplificar no solo la primera cadena positiva de la secuencia diana, sino también la primera cadena positiva de secuencia, segunda diana escindida. En una realización preferida, sin embargo, se usa un cuarto cebador reverso que difiere del primer cebador reverso, para amplificar la primera cadena positiva de secuencia, segunda diana escindida. En la Figura 4A, el cuarto cebador reverso corresponde al cebador reverso mutado (M\_R).

El mismo principio se aplica en la Figura 4B, en donde el primer cebador reverso corresponde al cebador reverso mutado (M\_R), el segundo cebador de avance corresponde al cebador de avance mutado (M\_F), el tercer cebador de avance se corresponde con el cebador de tipo salvaje el cebador de avance (WT-F), y el cuarto cebador reverso corresponde al cebador reverso de tipo salvaje (WT\_R).



En la etapa (c), se detectan las secuencias de ADN amplificadas en la etapa (b). La etapa (c) puede realizarse mediante varios métodos de detección conocidos en la técnica, por ejemplo, electroforesis en gel, electroforesis capilar, secuenciación de ADN. Preferiblemente, la etapa (c) se realiza mediante un método de secuenciación de ADN. Incluso más preferiblemente, el método de secuenciación de ADN es la secuenciación de Sanger, o la secuenciación por síntesis.

El método de la presente invención se puede usar con cualquier biblioteca de secuencias de ADN que tengan la estructura mostrada en la Figura 1A. El método se usa preferiblemente con una biblioteca de secuencias de ADN obtenidas por amplificación del genoma completo del sitio de restricción determinista.

De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un kit que comprende un primer y/o un segundo y/o un primer cebador como se definió anteriormente.

Más específicamente, el kit para detectar al menos una de al menos una primera secuencia de ADN diana y al menos una segunda secuencia de ADN diana de una biblioteca de secuencias de ADN, en donde la primera secuencia de ADN diana difiere de la segunda secuencia de ADN diana en que una sustitución o eliminación o inserción de nucleótidos única o múltiple en la segunda secuencia genera un sitio de restricción para una endonucleasa de restricción, dando lugar -si es escindido por la endonucleasa de restricción- a una primera secuencia, segunda diana 3' escindida del sitio de restricción generado y una segunda secuencia, segunda diana 5' escindida del sitio de restricción generado, y en donde cada una de las secuencias de ADN de la biblioteca comprende, respectivamente desde el extremo 5' al extremo 3', un primer segmento de secuencia que tiene una longitud de 15 a 50 nucleótidos, un segundo segmento de secuencia de ADN genómico escindido por la endonucleasa de restricción, y un tercer segmento de secuencia reversa complementaria a la unión del primer segmento de secuencia y, si hay alguno, el saliente 5' generado por la endonucleasa de restricción comprende:

- al menos un primer cebador reverso que se hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de la al menos una primera cadena positiva de secuencia diana o al menos una primera cadena positiva de secuencia, segunda diana escindida;

- al menos un segundo cebador de avance que se hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de al menos una primera cadena antipositiva de secuencia, segunda diana escindida;

- al menos un tercer cebador de avance que comprende una primera porción 5' que se hibrida con la región del extremo 5' del tercer segmento de secuencia de al menos una primera cadena antipositiva de la segunda secuencia escindida y una segunda porción 3' que se hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de al menos una primera cadena antipositiva de secuencia, segunda diana escindida, en donde la primera porción del al menos un tercer cebador de avance tiene una longitud de 20% a 80% con respecto a la longitud total de al menos un tercio primer delantero.

El kit preferiblemente comprende adicionalmente al menos un cuarto cebador reverso que hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de al menos una primera cadena positiva de secuencia, segunda diana escindida.

El kit puede usarse para detectar cualquier clase de mutación que genere o elimine un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción de los extremos del segundo segmento de secuencia de los fragmentos de ADN de la biblioteca. El kit se usa preferentemente en el diagnóstico de mutaciones en el gen ALK (receptor del factor de crecimiento epidérmico) EGFR o el PIK3CA (polipéptido alfa catalítico de la fosfatidilinositol 3-quinasa).

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Método de cebador bivalente

Se llevaron a cabo ensayos preliminares en líneas celulares SY5Y (SH-SY5Y ATCC No. de catálogo CRL-2266™), que albergan una sustitución heterocigótica de C a A en el codón 1174 del gen ALK, convirtiendo una fenilalanina en una leucina (F1174L); considerando la secuencia flanqueante, la sustitución heterocigótica introduce un nuevo sitio de restricción (RS) en el alelo mutado, mientras que el alelo de tipo salvaje no tiene ningún RS.

La Figura 2 es un esquema simplificado de las secuencias y transformaciones en la biblioteca de ADN de WGA producida por la mutación.

Para detectar mutaciones que ocurren en el RS, se probó el siguiente enfoque. El cebador universal de la amplificación completa del genoma (cebador DRS-WGA, SEQ ID NO: 1 que tiene la secuencia AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT) se explotó para diseñar un cebador 5' en un nuevo par de cebadores PCR en donde el cebador 3' se superpone a una región en 3' con respecto a la RS.

La estrategia consistió en diseñar un par de cebadores bivalentes que comprende:

- un cebador 5' que tiene un 95% de homología con el cebador DRS-WGA; y
- un cebador de PCR 3' que debería proporcionar la especificidad requerida para la PCR, para amplificar selectivamente la región diana en lugar de otros amplicones DRS-WGA.

5 Este par de cebadores bivalentes debería en teoría servir para la amplificación de la secuencia de tipo salvaje (WT) y la secuencia mutante (M).

10 La evidencia experimental muestra que esta metodología resulta ser pobre e inapropiada, y no puede garantizar la detección de la mutación en el RS. Como se muestra en la Figura 3, el uso de un cebador bivalente proporciona amplificación inespecífica, que da como resultado muchas bandas de amplificación que tienen tamaños diferentes, y bandas claramente distinguibles del tamaño esperado (por ejemplo, en células SY5Y únicas, portadoras de una mutación heterocigótica F1174L, aislado con DEPArray™ y amplificado con DRS-WGA. 132pb para la secuencia mutada, 169pb para la secuencia de WT). La amplificación no proporcionó una banda clara y específica en muestras mutadas (M), de tipo salvaje (WT) y de control negativo de PCR (C-). El control negativo de WGA (Ctr-), muestra solo una banda inespecífica.

15 Un factor que contribuye a este pobre resultado es que el cebador bivalente 5' que corresponde en un 95% al cebador WGA ligado, está presente en todos los fragmentos de ADN de la biblioteca DRS-WGA, y el cebador bivalente 3' no proporciona la reacción de PCR con suficiente especificidad.

20 Como ejemplo, la referencia del genoma humano (Homo Sapiens hg 19) comprende 3,095,693,981 bases. Si el genoma se digiere con una endonucleasa de restricción con un sitio de restricción de cuatro bases (por ejemplo, TTAA), la longitud media de los fragmentos de ADN generados es 4 (las bases posibles) a la potencia de 4 (longitud de la secuencia de digestión considerada) = 256. La biblioteca de ADN generada comprendería así aproximadamente 3,095,693,981/256 ~ 12.1 millones de fragmentos diferentes, con una suposición simplificada de una secuencia aleatoria de los nucleótidos en el ADN. Todos ellos comprenderían el mismo cebador 5' (que corresponde al cebador WGA de la PCR primaria).

El uso del par de cebadores bivalentes proporciona, por lo tanto, bandas inespecíficas.

25 **Ejemplo 2 - Límite de rango de homología de cebador híbrido**

Se llevaron a cabo pruebas de amplificación en la misma línea celular SY5Y que la utilizada en el Ejemplo 1, pero usando el método de la presente invención.

Para probar la amplificación de ambos alelos de tipo salvaje (WT) y mutados (M) en productos DRS-WGA, se aislaron células SY5Y individuales con DEPArray™, lo que proporciona células individuales puras.

30 La metodología de amplificación usando un cebador 5' de PCR que coincida con el cebador universal WGA en un 86% de su longitud proporcionó una solución para la amplificación del alelo WT ni del alelo M. Como se muestra en la Figura 5, la amplificación no proporcionó una banda clara y específica en muestras mutadas (M), de tipo salvaje (WT) y de control negativo de PCR (C-). El control negativo de WGA (Ctr-), muestra solo una banda inespecífica.

35 Se probaron cebadores que tenían diferentes porcentajes de homología con el cebador universal WGA. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

Cebador	Homología con el cebador WGA		Homología con el ADN original		F32 [# de base]	Prueba
Universal	21/22	95%	1/22	5%	0	KO
Mutante 1	19/22	86%	3/22	14%	1	KO
Mutante 2	10/20	50%	10/22	50%	8	OK
Mutante 3	14/22	64%	8/22	36%	6	OK

En la Tabla 1, la columna F32 reporta la longitud en número de bases de la "segunda porción del tercer cebador de avance", es decir, la porción del cebador que tiene la misma secuencia que el ADN original, excluyendo el saliente de la endonucleasa de restricción.

- 5 Es claro a partir de los resultados de la Tabla 1 que es necesario identificar un compromiso equilibrado para cumplir los requisitos del método. Varias pruebas han demostrado que el porcentaje ideal de identidad del cebador híbrido con el cebador universal WGA es del 20% al 80%, con una eficacia incluso mejor en el rango de 40% a 60%.

**Ejemplo 3 Introducción de un nuevo RS en el alelo mutante (gen ALK) - diseño del ensayo**

- 10 El método según la invención garantiza la amplificación (y la secuenciación) incluso en el caso de una digestión incompleta por la endonucleasa de restricción. De hecho, la actividad de la endonucleasa de restricción no está garantizada para todos los RS en el ADN diana, y estadísticamente un pequeño porcentaje de RS no digerido está presente en el DRS-WGA, que sin embargo se amplifica con éxito mediante DRS-WGA, aunque estando el cebador WGA- (PCR primario) en otro RS.

En el caso de un sitio no digerido, el uso para el ensayo de mutación de solo un par de cebadores diseñado para la secuencia mutante no permitiría la amplificación y la secuenciación del objetivo.

- 15 Se llevaron a cabo de nuevo pruebas de amplificación en la línea celular SY5Y, que, como se ha descrito previamente, alberga una sustitución heterocigótica de C a A en el codón 1174, convirtiendo una fenilalanina en una leucina (F1174L). La sustitución heterocigótica introduce así un nuevo RS en el alelo mutado, mientras que el alelo de tipo salvaje no tiene ningún RS.

- 20 Las secuencias de cebador de PCR usadas para la amplificación de los alelos WT y M se muestran en la Tabla 2. Para el cebador de avance de alelo mutante, la primera porción de la secuencia de cebador homóloga al cebador WGA se muestra en negrita y subrayada, mientras que la segunda porción del cebador que tiene la misma secuencia que el ADN original, excluyendo el saliente de la endonucleasa de restricción, (F32 = 8 bases) se muestra en recuadro.

Tabla 2

Nombre Cebador		Secuencia	
ALK_WT_F	SEQ ID NO:2	5' CCTCTCTGCTCTGCAGCAAAT	3'
ALK_WT_R	SEQ ID NO:3	5' TCTCTCGGAGGAAGGACTTGAG	3'
ALK_M1_F	SEQ ID NO:4	5' <b><u>TGCTGTCAGT</u></b> TA <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AACCACCA</span>	3'
ALK_M1_R	SEQ ID NO:5	5' GGTCTCTCGGAGGAAGGACT	3'

- 25 Para probar la amplificación de los alelos WT y M en los productos DRS-WGA, se aislaron células SY5Y individuales con DEPAarray™, que proporciona células individuales puras.

Como control negativo para la detección de la mutación, los linfocitos individuales también se aislaron con DEPAarray™ y se amplificaron con DRS-WGA.

- 30 La amplificación por PCR del alelo WT tanto en WT (linfocitos) como en M heterocigotos (SY5Y) se logró perfectamente mediante el uso del cebador WT 5' específicamente diseñado, que permite la amplificación exclusiva del alelo WT.

Como se puede observar en la Figura 6, no hay productos de amplificación específicos. En cambio, la banda de PCR esperada (132 pb) es claramente distinguible.

- 35 El cebador 5' específico de M se ensayó para los mismos linfocitos y células SY5Y para detectar la especificidad de la amplificación proporcionada por el cebador diseñado que se extiende a lo largo de la secuencia diana y el cebador universal DRS-WGA.

Como puede verse en la Figura 7, en este caso, como se esperaba, la amplificación específica se obtuvo solo en el ADN de DRS-WGA de una sola célula SY5Y. El ADN DRS-WGA de los linfocitos, siendo WT para la mutación diana, fue negativo para la amplificación esperada, y solo estaban presentes amplificaciones de PCR inespecíficas.

5 Para demostrar que la amplificación lograda fue específica y permitió la secuenciación, todos los productos de amplificación se secuenciaron a partir de su extremo 3'. Se confirmó el estado WT o M correspondiente para todos los productos de amplificación que muestran la especificidad lograda con el método descrito. Un ejemplo de secuenciación de un alelo WT se muestra en la Figura 8, mientras que un ejemplo de secuenciación de un alelo M se muestra en la Figura 9.

Los resultados se resumen en la Tabla 3.

10

Tabla 3

	Replicados de células individuales	Secuencia obtenida con el cebador 5' específico para M	Secuencia obtenida con el cebador 5' específico para WT
WBC	1	Sin producto de PCR	WT
	2	Sin producto de PCR	WT
	3	Sin producto de PCR	WT
SY5Y	1	M	WT
	2	M	WT
	3	M	WT

15

En una realización preferida, la segunda porción (F32) del tercer cebador de avance (F3) es más corta que 30 nucleótidos para no cebar erróneamente en la primera cadena antipositiva de secuencia diana (FTSAS), -es decir, la secuencia de tipo salvaje en este ejemplo-, iniciando así una reacción de PCR que puede dar como resultado un falso positivo (según su longitud y secuencia de producto de PCR). Más preferiblemente, la longitud de la segunda porción (F32) es más corta que 20 nucleótidos. Incluso más preferiblemente, la longitud de dicha segunda porción (F32) de dicho tercer cebador de avance (F3) es más corta o igual a 10 nucleótidos.

20

La segunda porción (F32) del tercer cebador de avance (F3) no debe ser demasiado corta para no que no proporcione insuficiente especificidad (véanse, por ejemplo, los resultados en la tabla I). En particular, la longitud de dicha segunda porción del tercer cebador de avance, debe ser mayor que la longitud de la secuencia consenso del sitio de restricción menos la longitud del saliente 5' del ADN digerido, todo dividido por dos. Con el fin de obtener una especificidad mayor, la segunda porción (F32) del tercer cebador de avance (F3) debe ser de al menos 3 nucleótidos, e incluso más preferiblemente al menos 6 nucleótidos, más larga que la secuencia de consenso del sitio de restricción menos la longitud del saliente 5' del ADN digerido, todo dividido por dos.

25

#### **Ejemplo 4 Introducción de un nuevo RS en el alelo mutante (gen ALK) - validación del ensayo**

El método descrito anteriormente se ha validado adicionalmente con 54 células individuales:

30

- 10 SY5Y vivas individuales, frescas;
- 19 SY5Y individuales, previamente fijadas con paraformaldehído al 2% (PFA) durante 20 minutos a temperatura ambiente, y permeabilizadas con Inside Perm (Miltenyi Biotec);
- 19 SY5Y individuales, previamente fijadas con CytoChex™, y permeabilizadas con Inside Perm;
- 2 linfocitos individuales, vivos y frescos;
- 2 linfocitos individuales, previamente fijados con 2% de PFA 20 minutos a temperatura ambiente, y permeabilizados con Inside Perm (Miltenyi Biotec).

## ES 2 674 122 T3

El método amplificó el alelo WT en el 100% de las células SY5Y y linfocitos, y el alelo mutante se amplificó en 9/10=90% de SY5Y vivas, 16/19=84% de las células SY5Y fijadas y permeabilizadas con Cyto-Chex/Inside-Perm, 17/19=89% de las células SY5Y fijadas y permeabilizadas con PFA 2% 20' a temperatura ambiente/dentro de Perm, y 0/4=0% de los linfocitos.

5 Los resultados se muestran en la Figura 10 y se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

		ALK	
		PCR de alelo WT	PCR de Alelo F1174L M
SY5Y	Vivas	100%	90%
	CytoChex, Inside Perm	100%	84%
	PFA, Inside Perm	100%	89%
Linfocitos	Vivas	100%	0%
	PFA, Inside Perm	100%	0%

Estos resultados muestran la eficacia y la solidez del método de la presente invención en un número mayor de muestras.

10 **Ejemplo 5 Eliminación de un RS en el alelo mutante (gen EGFR) - diseño del ensayo**

Se llevaron a cabo ensayos de amplificación en la línea celular HCC-827, que alberga una eliminación de 5 codones en el gen EGFR. La eliminación retira un sitio de restricción (RS), lo que permite la detección del alelo M, pero no del alelo WT que tiene el RS, cuando se utiliza una sola PCR y pares de cebadores en el genoma humano.

Se aislaron células HCC-827 individuales con DEPAarray™, junto con linfocitos como control de la condición WT.

15 Se diseñaron dos pares de cebadores diferentes dirigidos para el alelo M (con el RS eliminado) y el alelo WT (que aún mantiene el RS) y condujeron a la identificación correcta de las condiciones tanto WT como M.

20 Las secuencias de cebador de PCR usadas para la amplificación de alelos WT y M se muestran en la Tabla 5. Para el cebador de avance de alelo de tipo salvaje, la primera porción de la secuencia de cebador homóloga al cebador WGA se muestra en **negrita y subrayado**, mientras que la segunda parte del cebador que tiene la misma secuencia que el ADN original, excluyendo el saliente de la endonucleasa de restricción, (F32 = 16b) se muestra en recuadro.

Tabla 5

Nombre del cebador		Secuencia
Ex19_M_F	SEQ ID NO:6	5' <b><u>TAAAAT</u></b> TC <del>CGT</del> CGCTATCAA3'
Ex19_M_R	SEQ ID NO:7	5'TGTGGAGATGAGCAGGGTCTAG3'
Ex19_WT_F	SEQ ID NO:8	

Nombre del cebador		Secuencia
		5' <u>CTGTCAGT</u> TAA <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GAGAAGCAACATCTCC</span> 3
Ex19_WT_R	SEQ ID NO:9	5'AGAGCAGCTGCCAGACATGAG3'

La Figura 11 muestra los resultados de la amplificación por PCR de las células individuales M y WT con pares de cebadores de M, mientras que la Figura 12 muestra los resultados de la amplificación por PCR de las células individuales M y WT con pares de cebadores de WT.

- 5 La Figura 13 muestra una secuencia de cadena reversa de una sola célula WT, en comparación con el ADN amplificado con DRS-WGA, mientras que la Figura 14 muestra una secuencia de cadena reversa de una sola célula M, en comparación con el ADN amplificado con DRS-WGA.

**Ejemplo 6 Eliminación de un RS en el alelo mutante (gen EGFR) -validación del ensayo**

El método descrito anteriormente se ha validado adicionalmente con 60 células individuales:

- 10 - 31 HCC-827 individuales, tratadas según el protocolo de enriquecimiento Veridex CellSearch;  
 - 11 linfocitos individuales, tratados según el protocolo de enriquecimiento Veridex CellSearch;  
 - 17 linfocitos individuales, vivos y frescos.

El método amplificó el alelo WT en 28/31=90% de la HCC-827 individual y el alelo M en 31/31=100% de la HCC-827 individual.

- 15 Teniendo en cuenta los 11 linfocitos tratados con Veridex, 11/11=100% dio como resultado un producto de PCR positivo para la PCR de WT, 3/11=27% dio como resultado un producto de PCR positivo para la PCR de M. Estos productos fueron secuenciados y confirmados como WT. Por lo tanto, al detectar el ADN mediante secuenciación, la especificidad en los linfocitos tratados con Veridex sigue siendo del 100%, mientras que, basándose únicamente en la positividad de la PCR, la especificidad es (en esta prueba) 8/11=73%. La detección de la longitud del producto de ADN por electroforesis en gel permitiría de manera similar distinguir la longitud y determinar que en realidad es WT; detectar el producto de ADN mediante PCR en tiempo real no distinguiría entre productos WT y M. Teniendo en cuenta los 17 linfocitos frescos, 17/17=100% dio como resultado un producto de PCR positivo para la PCR de WT, 0/17=0% dio como resultado un producto de PCR positivo para la M-PCR. Estos productos fueron secuenciados y confirmados como WT.

- 25 Como hay 2 alelos de WT por linfocito, la diferencia en RS no digerido entre los linfocitos tratados con Veridex (3/22=14%) y los linfocitos frescos (0/34=0%) es estadísticamente significativa.

Esto demuestra la solidez del método descrito anteriormente en el caso de una actividad de digestión de RE incompleta.

Los resultados se muestran en la Figura 15 y se resumen en la Tabla 6.

30 Tabla 6

EGFR Exon19				
	Tratamiento	n	PCR de alelo WT	PCR de Allele M Elim. E746_A750
HCC-827	Veridex	31	90%	100%
WBC	Veridex	11	100%	27% (*)

EGFR Exon19				
	Tratamiento	n	PCR de alelo WT	PCR de Allele M Elim. E746_A750
WBC	Frescos	17	100%	0%
(*) Todas las secuencias WT				

5 Los ejemplos anteriores muestran que el método de acuerdo con la presente invención garantiza la amplificación (y la secuenciación) incluso en el caso de una actividad de digestión incompleta de la endonucleasa de restricción. La actividad de la RE no siempre puede garantizar la digestión efectiva de todos los RS presentes en el ADN diana, debido al tratamiento al que las células han estado sometidas (como en el ejemplo anterior), o por otras razones relacionadas con la secuencia específica alrededor el sitio de restricción.

Estadísticamente, un pequeño porcentaje de RS no digerido está presente en el DRS-WGA, que, sin embargo, tiene éxito con Amplificación de Genoma Completo, no obstante el cebador universal (PCR primario) conectado a otro RS.

10 En el caso de un sitio no digerido, el uso de solo una PCR para la tercera secuencia diana (con MDRS) no permitiría la amplificación y la secuenciación de dicho objetivo. En caso de una digestión incompleta del ADN por la enzima de restricción, el método de la invención permite la detección del alelo WT y M cuando están presentes en la biblioteca DRS-WGA.

15 La figura 16 muestra un ejemplo de los resultados de secuenciación de uno de los tres linfocitos tratados con Veridex positivos para la M-PCR. Este es el caso de la segunda secuencia diana (con MDRS, pero no digerida durante WGA), amplificada y secuenciada correctamente con el segundo cebador de avance.

**Ejemplo 7 Introducción de un nuevo RS en el alelo mutante (gen PIK3CA).**

Como otro ejemplo, la mutación M1043I, del exón 21 del gen PIK3CA que proviene del cambio de un solo nucleótido ATG/TAAT, puede detectarse mediante el método de acuerdo con la presente invención.

20 A partir de un análisis de las características del método y el kit de la presente invención, las ventajas resultantes son evidentes.

En particular, en virtud del diseño particular de los cebadores utilizados para amplificar mediante PCR la biblioteca de secuencias de ADN, el método permite detectar diferencialmente la primera secuencia de ADN diana y la segunda secuencia de ADN diana (que difiere en la presencia de un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción del DRS-WGA) con gran especificidad y robustez.

25 Además, el uso de un cuarto cebador reverso permite una detección aún más específica y robusta y una detección basada en el tamaño del amplicón, que es rápida, simple y rentable.

Además, el método de la presente invención se puede aplicar corriente abajo de la amplificación del genoma completo del sitio de restricción determinista para detectar mutaciones de una manera específica y robusta. Estas mutaciones son imposibles de detectar de otra manera con los métodos de detección tradicionales disponibles.

30 Además, el uso de un método de secuenciación de ADN, en particular la secuenciación o pirosecuenciación de Sanger, garantiza la detección correcta incluso de los falsos positivos que podrían ocurrir en el caso de la digestión incompleta de la endonucleasa de restricción de la biblioteca de ADN.

Además, un porcentaje de identidad de 20% a 80%, mejor de 40% a 60%, del tercer cebador de avance con el cebador WGA permite obtener un resultado óptimo.

35 Finalmente, está claro que se pueden realizar modificaciones y variantes del método y el kit descritos y mostrados sin que esto se aparte del alcance de la protección de las reivindicaciones adjuntas.

En particular, el método se puede multiplexar usando pares adicionales de cebadores que no interfieren con la amplificación por PCR con el primer, segundo, tercer y posiblemente cuarto cebador.

Adicionalmente, uno o más de dichos cebadores pueden incluir además una secuencia de extremo 5' que no se hibrida con ninguna de dichas cadenas positivas o antipositivas de la secuencia diana primera o segunda. Esta característica se puede usar ventajosamente para uno o más de los siguientes propósitos:

- codificación de barras de los productos de PCR con una etiqueta de muestra,
- 5 - introducir en el producto de PCR un adaptador para la secuenciación de próxima generación
- evitar el cebado espurio en la reacción de PCR diana multiplexada.

Además, como los productos de WGA de la reacción de PCR pueden mostrar alguna señal de fondo, puede ser una ventaja usar un cebador diferente para la secuenciación. Esto agrega una capa adicional de especificidad, mejorando la relación de señal a ruido y la legibilidad gráfica de secuencia.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Silicon Biosystems S.p.A.

<120> MÉTODO Y KIT PARA DETECTAR UNA SECUENCIA DE ADN DIANA DE TIPO SALVAJE Y/O MUTADA

<160> 9

<170> BiSSAP 1.0

15 <210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <221> fuente

<222> 1..21

<223> /mol\_tipo="ADN"

/nota="cebador WGA universal"

/organismo="Artificial"

25 <400> 1

agtgggattc ctgctgtcag t 21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> fuente



<222> 1..21

<223> /mol\_tipo="ADN"

/nota="ALK\_WT\_F"

/organismo="Homo sapiens"

5 <400> 2

cctctctgct ctgcagcaaa t 21

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> fuente

<222> 1..22

<223> /mol\_tipo="ADN"

15 /nota="ALK\_WT\_R"

/organismo="Homo sapiens"

<400> 3

tctctcggag gaaggacttg ag 22

<210> 4

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> fuente

25 <222> 1..20

<223> /mol\_tipo="ADN"

/nota="ALK\_M1\_F"

/organismo="Homo sapiens"

<400> 4

tgctgtcagt taaaccacca 20

<210> 5

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> fuente

<222> 1..20

10 <223> /mol\_tipo="ADN"

/nota="ALK\_M1\_R"

/organismo="Homo sapiens"

<400> 5

ggtctctcgg aggaaggact 20

15 <210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

20 <221> fuente

<222> 1..21

<223> /mol\_tipo="ADN"

/nota="Ex19\_M\_F"

/organismo="Homo sapiens"

25 <400> 6

taaaattccc gtcgctatca a 21

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> fuente

5 <222> 1..22

<223> /mol\_tipo="ADN"

/nota="Ex19\_M\_R"

/organismo="Homo sapiens"

<400> 7

10 tgtggagatg agcagggtct ag 22

<210> 8

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> fuente

<222> 1..27

<223> /mol\_tipo="ADN"

/nota="Ex19\_WT\_F"

20 /organismo="Homo sapiens"

<400> 8

ctgtcagtta agagaagcaa catctcc 27

<210> 9

<211> 21

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> fuente

## ES 2 674 122 T3

<222> 1..21

<223> /mol\_tipo="ADN"

/nota="Ex19\_WT\_R"

/organismo="Homo sapiens"

5 <400> 9

agagcagctg ccagacatga g 21

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar al menos una de al menos una primera secuencia de ADN diana y al menos una segunda secuencia de ADN diana de una biblioteca de secuencias de ADN, en donde la primera secuencia de ADN diana difiere de la segunda secuencia de ADN diana en que una sustitución o eliminación o inserción de nucleótidos individuales o múltiples en la segunda secuencia diana genera un sitio de restricción para una endonucleasa de restricción, dando lugar - si se escinde por la endonucleasa de restricción - a una primera secuencia, segunda diana 3' escindida del sitio de restricción generado y una segunda secuencia, segunda diana 5' escindida del sitio de restricción generado, que comprende los pasos de:
- 5
- (a) proporcionar la biblioteca de secuencias de ADN, comprendiendo cada una de las secuencias de ADN, respectivamente, desde el extremo 5' hasta el extremo 3', un primer segmento de secuencia que tiene una longitud de 15 a 50 nucleótidos, un segundo segmento de secuencia de ADN genómico tal como es escindido por la endonucleasa de restricción, y un tercer segmento de secuencia reversa complementaria a la unión del primer segmento de secuencia y, si lo hay, el saliente en 5' generado por la endonucleasa de restricción;
- 10
- (b) amplificar la biblioteca de secuencias de ADN mediante PCR usando:
- 15
- al menos un primer cebador reverso que se hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de la al menos una primera cadena positiva de secuencia diana o al menos una primera cadena positiva de secuencia, segunda diana escindida;
  - al menos un segundo cebador de avance que se hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de la al menos una primera cadena antipositiva de la secuencia diana;
- 20
- al menos un tercer cebador de avance que comprende una primera porción 5' que se hibrida con la región de extremo 5' del tercer segmento de secuencia de la al menos una primera cadena antipositiva de secuencia, segunda diana escindida y una segunda porción 3' que hibrida con la región de extremo 3' del segundo segmento de secuencia de la al menos una primera cadena antipositiva de secuencia, segunda diana escindida, en donde la primera porción del al menos un tercer cebador de avance tiene una longitud de 20% a 80% con respecto a la longitud total de al menos un tercer cebador de avance.
- 25
- (c) detectar secuencias de ADN amplificadas en la etapa (b).
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa (b) usa además al menos un cuarto cebador reverso que se hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de al menos una primera cadena positiva de secuencia, segunda diana escindida.
- 30
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la biblioteca de secuencias de ADN se obtiene por amplificación del genoma completo del sitio de restricción determinista.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, en donde la etapa (c) se realiza mediante un método de secuenciación de ADN.
- 35
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el método de secuenciación de ADN es la secuenciación o secuenciación de Sanger por síntesis.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la primera parte del al menos un tercer cebador de avance tiene una longitud de 40% a 60% con respecto a la longitud total del al menos un tercer cebador de avance.
- 40
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha segunda porción del al menos un tercer cebador de avance tiene una longitud en bases comprendida entre un mínimo correspondiente a la secuencia consenso de dicha endonucleasa de restricción menos, si la hay, el saliente en 5' generadas por la endonucleasa de restricción, todo dividido por dos, y un máximo de 30 bases.
- 45
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos uno de dichos cebadores comprende además una región de extremo 5' que no hibrida con ninguna de dicha primera o segunda secuencia diana, cadena positiva o antipositiva.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la endonucleasa de restricción es Msel.

10. Un kit para detectar al menos una de al menos una primera secuencia de ADN diana y al menos una segunda secuencia de ADN diana de una biblioteca de secuencias de ADN, en donde la primera secuencia de ADN diana difiere de la segunda secuencia de ADN diana en que una sustitución o eliminación o inserción de nucleótidos individuales o múltiples en la segunda secuencia diana genera un sitio de restricción para una endonucleasa de restricción, dando lugar - si se escinde por la endonucleasa de restricción - a una primera secuencia, segunda diana 3' escindida del sitio de restricción generado y una segunda secuencia, segunda diana 5' escindida del sitio de restricción generado, y en donde cada una de las secuencias de ADN de la biblioteca comprende, respectivamente desde el extremo 5' al extremo 3', un primer segmento de secuencia que tiene una longitud de 15 a 50 nucleótidos, un segundo segmento de secuencia de ADN genómico escindido por la endonucleasa de restricción, y un tercer segmento de secuencia reversa complementaria a la unión del primer segmento de secuencia y, si la hay, el saliente en 5' generado por la endonucleasa de restricción, que comprende:
- 5
- 10
- al menos un primer cebador reverso que se hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de la al menos una primera cadena positiva de secuencia diana o al menos una primera cadena positiva de secuencia, segunda diana escindida;
- 15
- al menos un segundo cebador de avance que se hibrida con la región del extremo 3' del segundo segmento de secuencia de la al menos una primera cadena antipositiva de la secuencia diana;
  - al menos un tercer cebador de avance que comprende una primera porción 5' que se hibrida con la región de extremo 5' del tercer segmento de secuencia de la al menos una primera cadena antipositiva primera cadena positiva de secuencia, segunda diana escindida y una segunda porción 3' hibrida con la región de extremo 3' del segundo segmento de secuencia de la al menos una primera cadena antipositiva de secuencia, segunda diana escindida, en donde la primera porción del al menos un tercer cebador de avance tiene una longitud de 20% a 80% con respecto a la longitud total de al menos un tercer cebador de avance.
- 20
11. El kit de acuerdo con la reivindicación 10 para uso en el diagnóstico de mutaciones ALK o EGFR o PIK3CA.

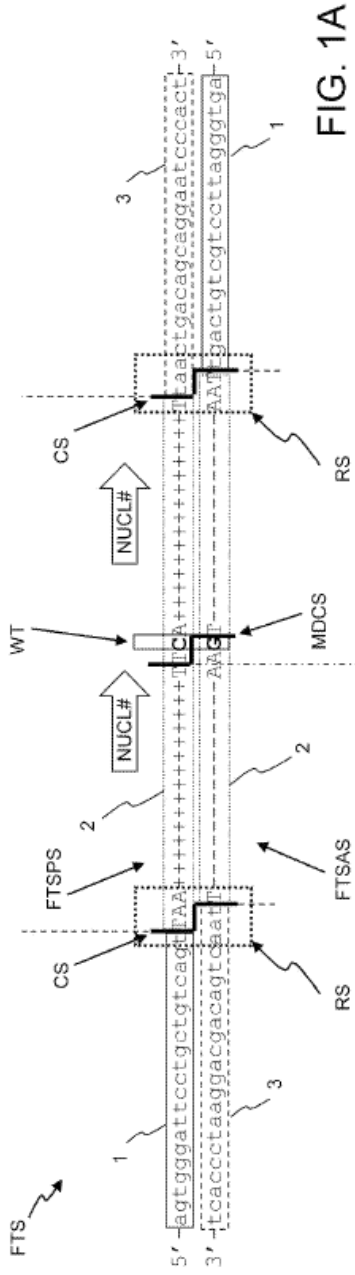


FIG. 1A

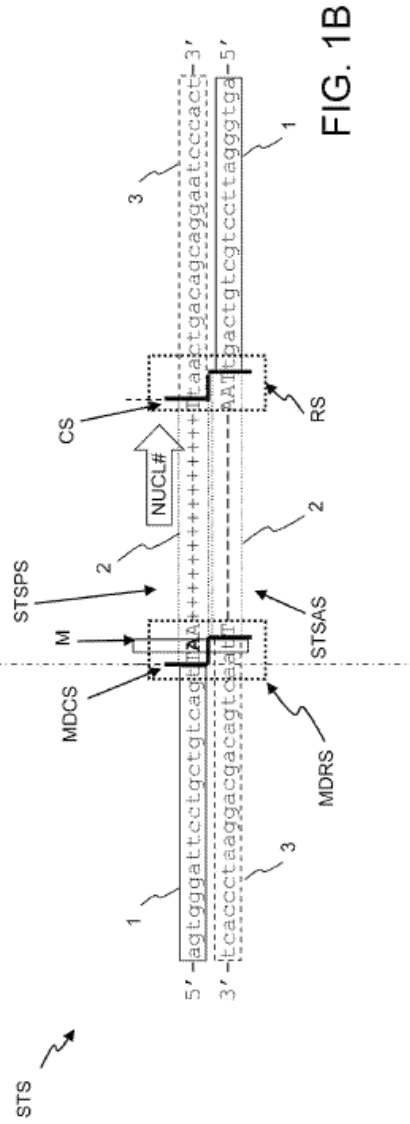


FIG. 1B

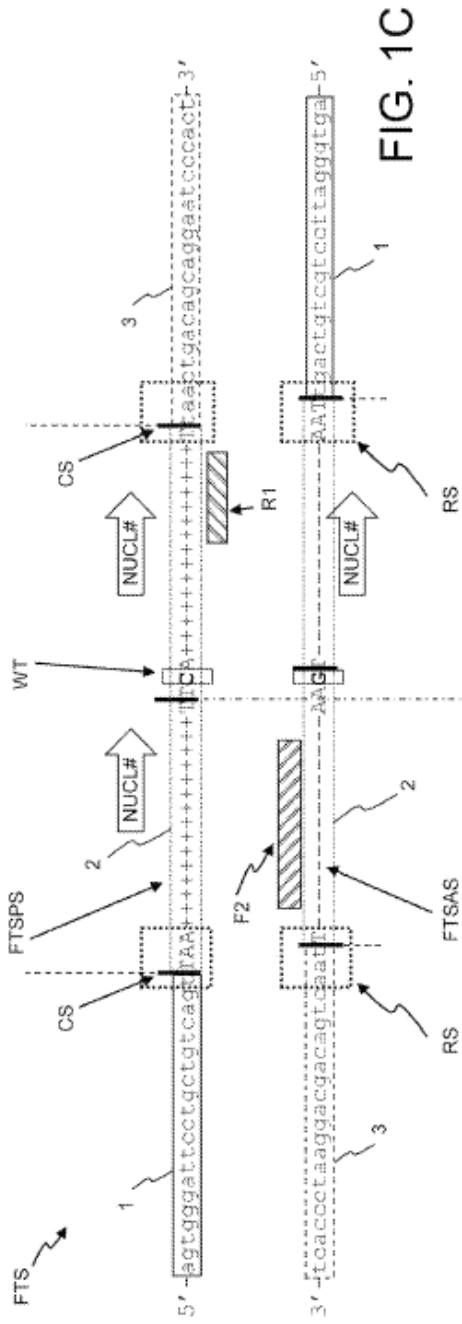


FIG. 1C

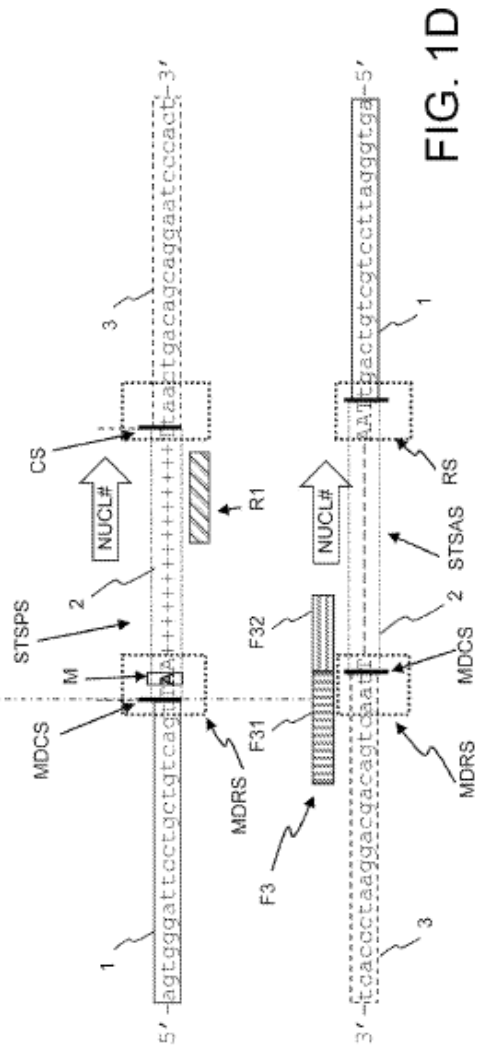


FIG. 1D



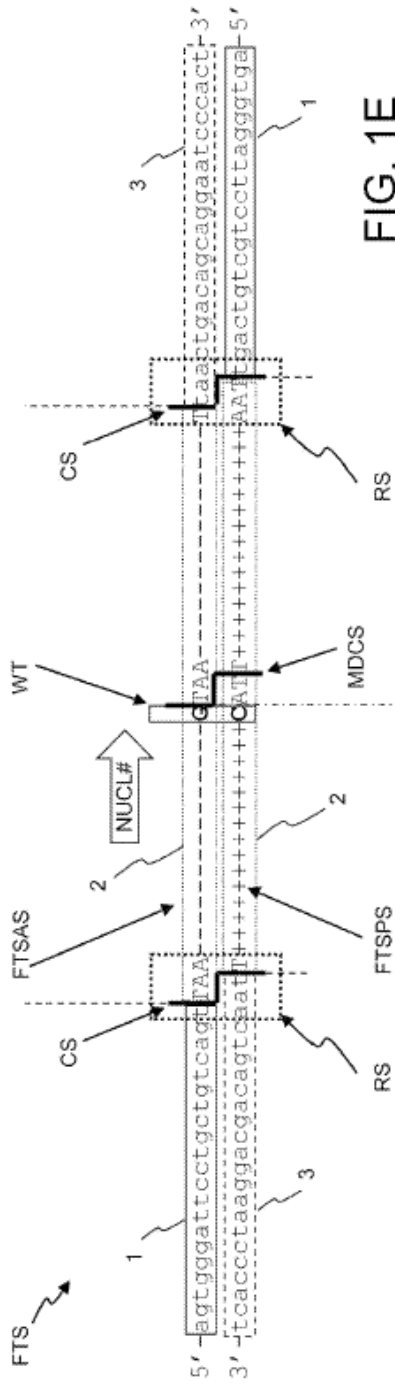


FIG. 1E

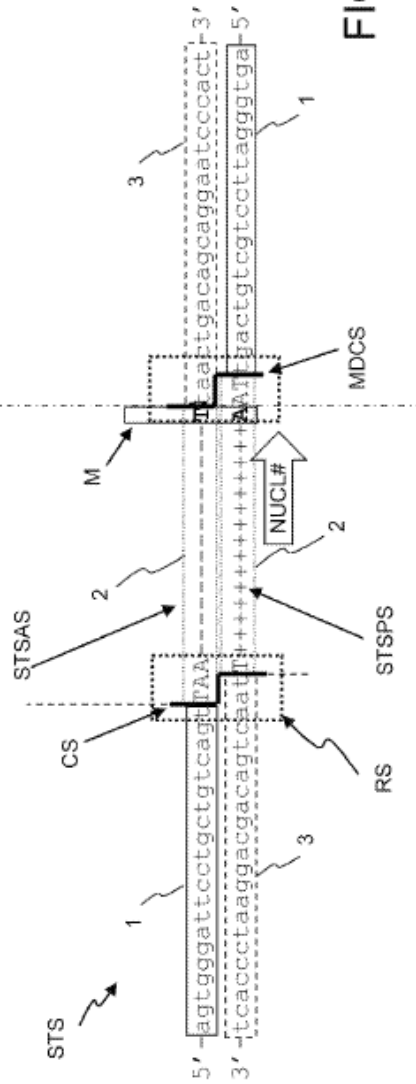


FIG. 1F

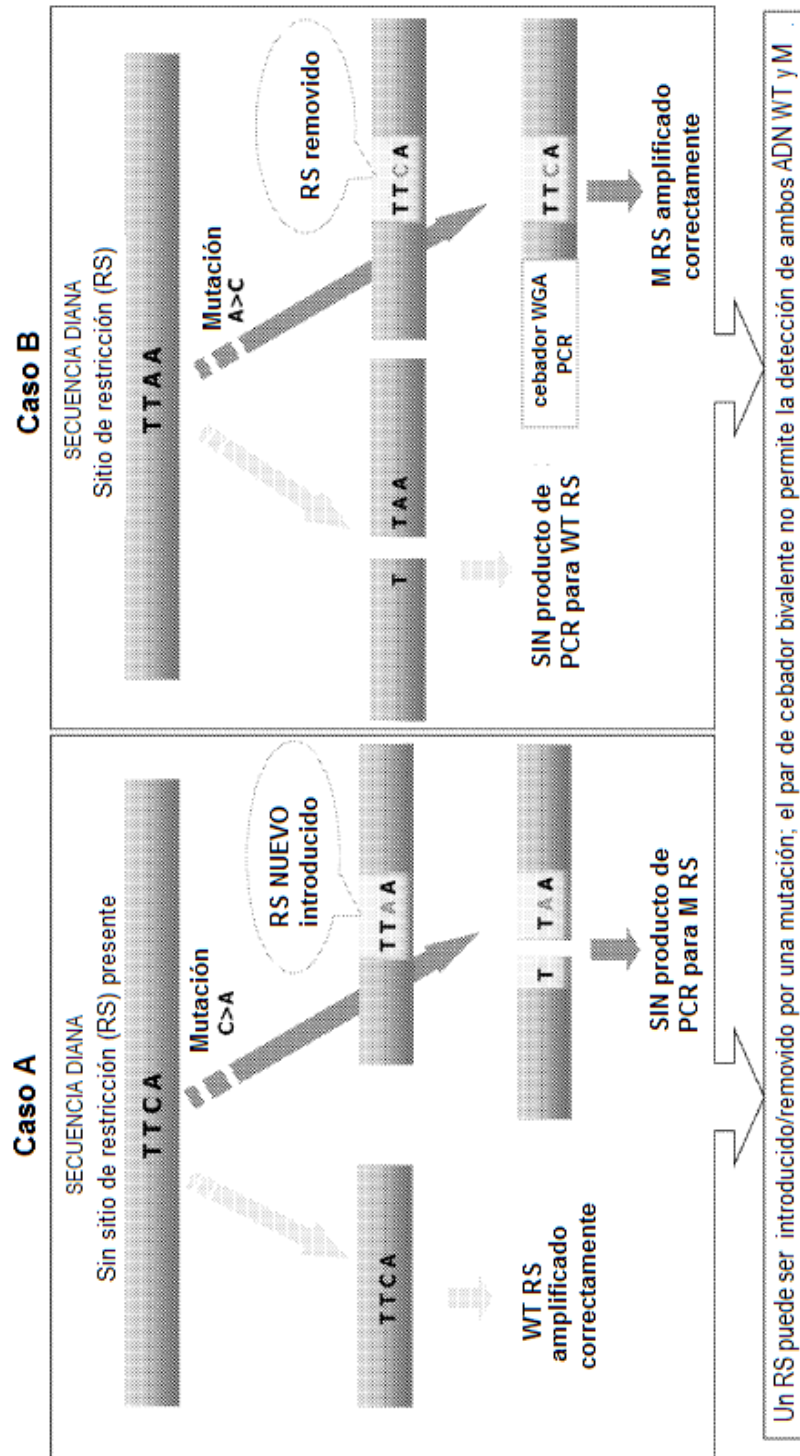


FIG. 2

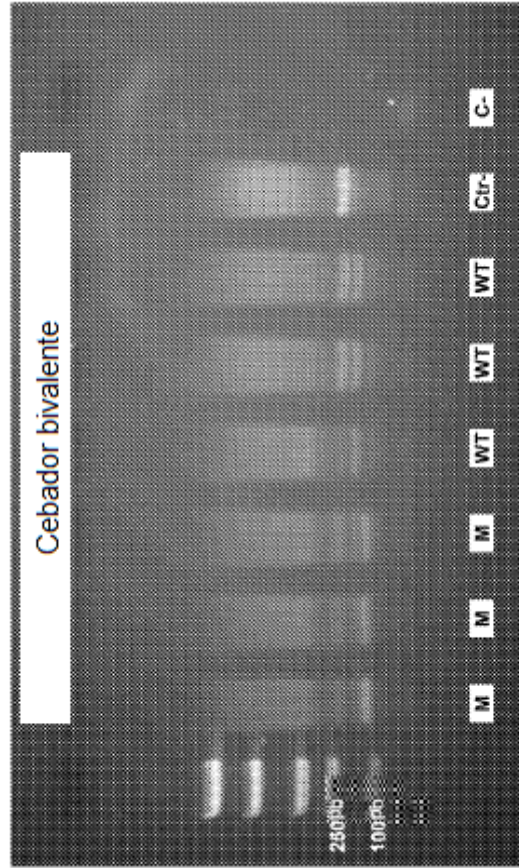


FIG. 3

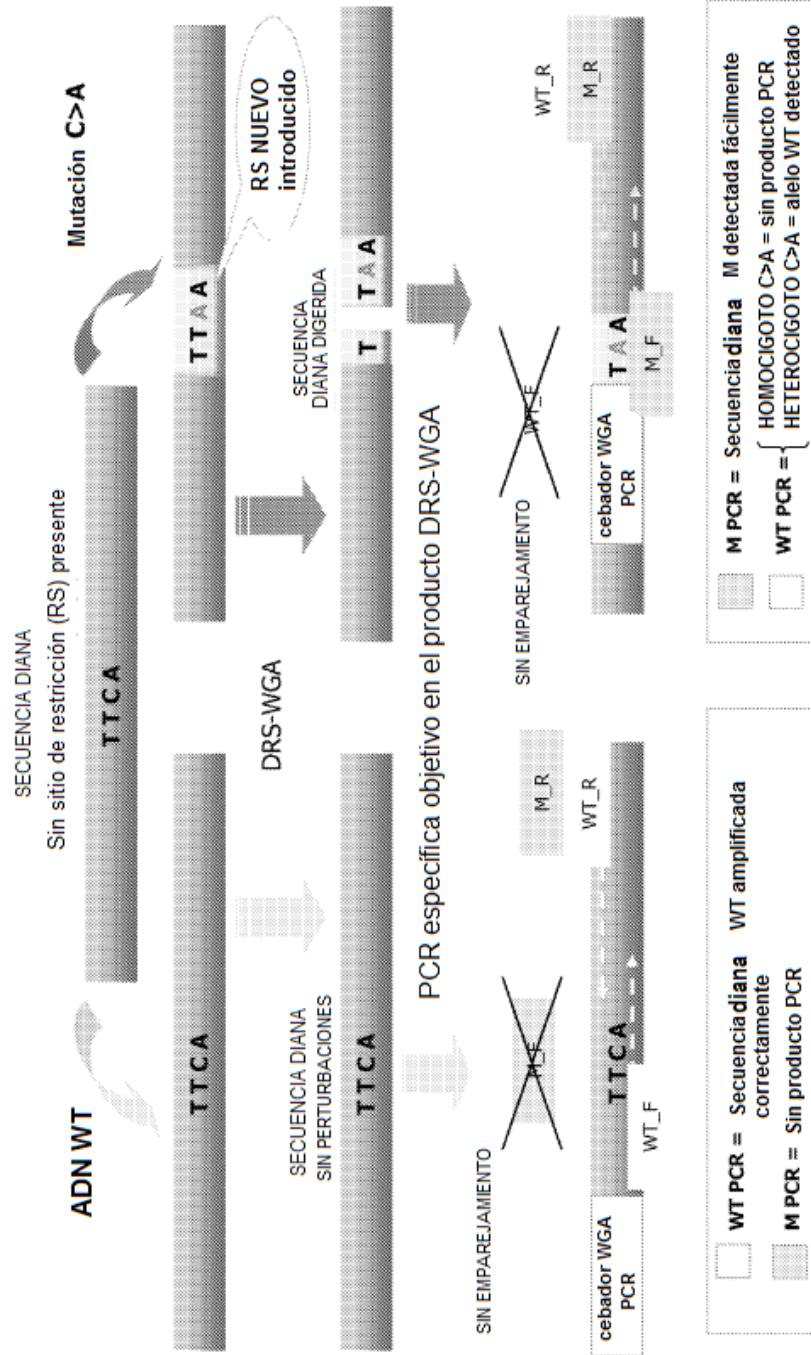


FIG. 4A

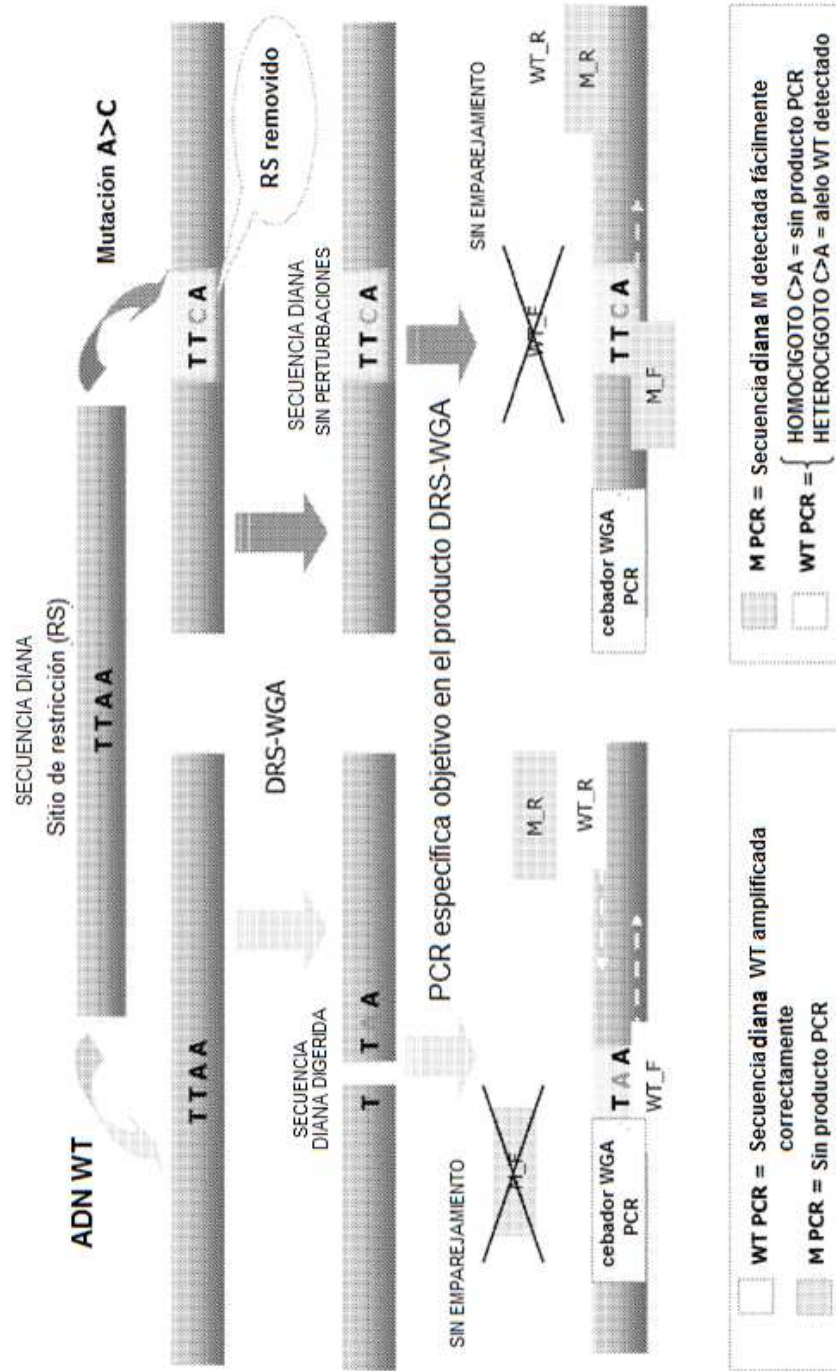


FIG. 4B

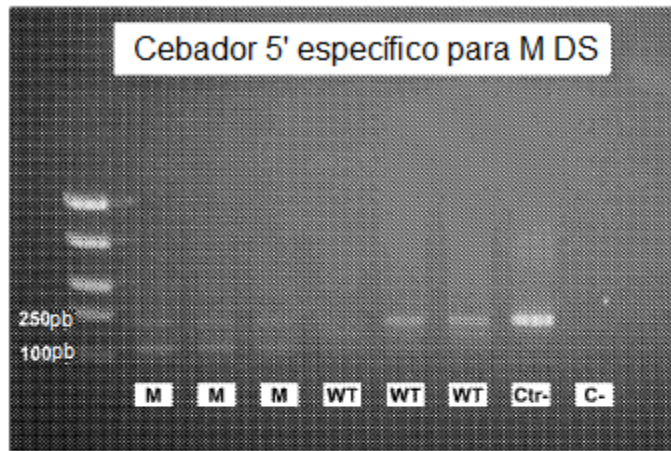


FIG. 5

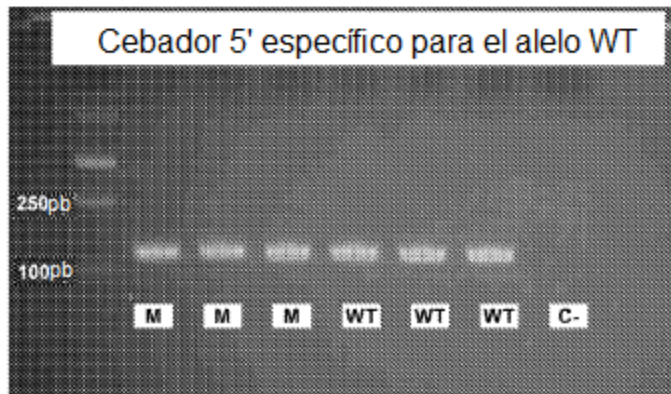


FIG. 6

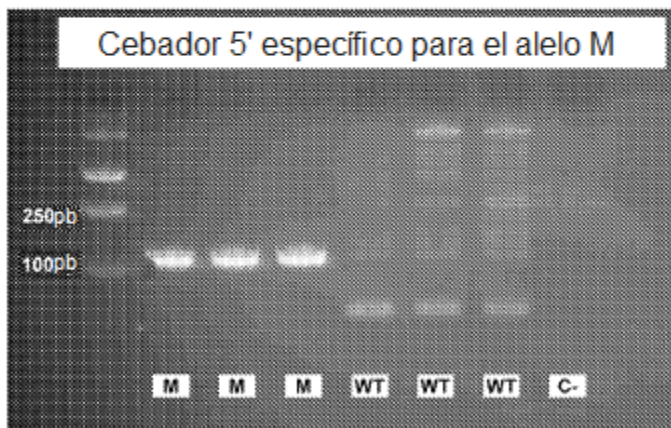


FIG. 7

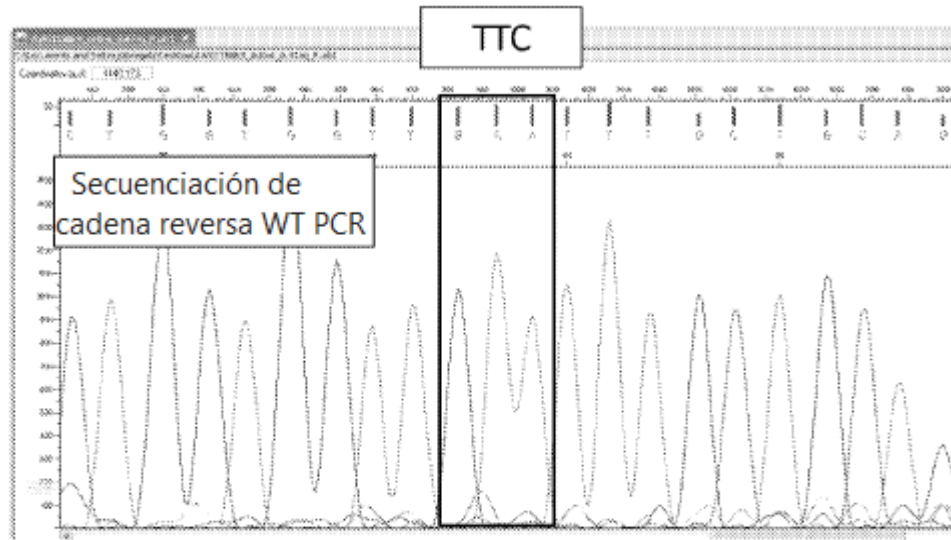


FIG. 8

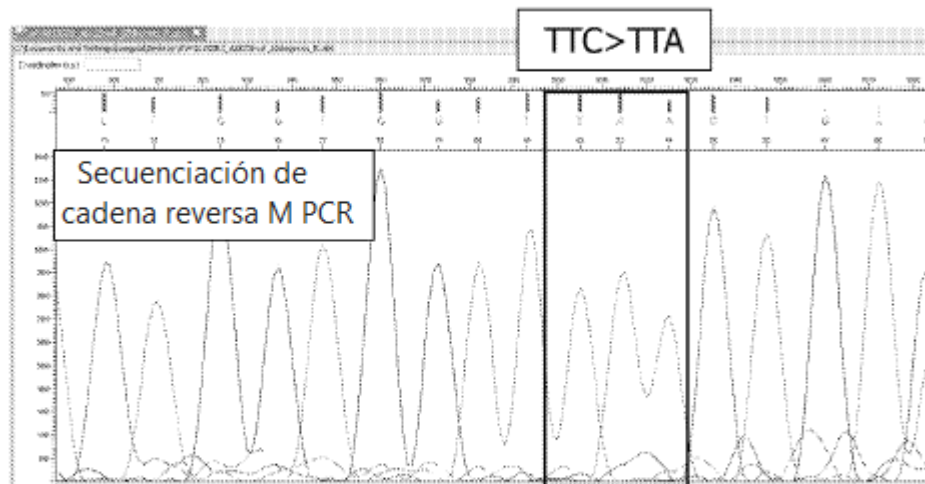


FIG. 9

ID de célula	Tipo de célula	# de célula	Fijación	Permeabilización	ALK F1174 L	
					Alelo WT	Alelo M
AWG1152R1	SY5Y	1	Vivo	na	1	1
AWG1152R2	SY5Y	1	Vivo	na	1	1
AWG1152R3	SY5Y	1	Vivo	na	1	1
AWG1152R4	SY5Y	1	Vivo	na	1	0
AWG1152R5	SY5Y	1	Vivo	na	1	1
AWG1152R6	SY5Y	1	Vivo	na	1	1
AWG1152R7	SY5Y	1	Vivo	na	1	1
AWG1152R8	SY5Y	1	Vivo	na	1	1
AWG1152R9	SY5Y	1	Vivo	na	1	1
AWG1152R10	SY5Y	1	Vivo	na	1	1
AWG1157R1	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1157R2	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	0
AWG1157R3	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1157R4	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1157R5	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1157R6	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	0
AWG1157R7	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	0
AWG1157R8	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1157R9	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1157R10	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1159R1	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1159R3	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1159R4	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1159R5	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1159R6	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1159R7	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1159R8	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1159R9	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1159R10	SY5Y	1	CITO-CHEX	DENTRO PERM	1	1
AWG1153R1	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1153R2	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1153R3	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1153R4	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1153R5	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1153R6	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1153R7	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1153R8	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1153R9	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	0
AWG1153R10	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1158R1	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1158R2	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1158R3	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1158R4	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1158R5	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	0
AWG1158R6	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1158R7	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1158R8	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1158R9	SY5Y	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	1
AWG1106R1	PBMC	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	0
AWG1106R2	PBMC	1	PFA 2% 20' TA	DENTRO PERM	1	0
AWG1162R1	PBMC	1	Vivo	na	1	0
AWG1162R2	PBMC	1	Vivo	na	1	0

FIG. 10





FIG. 11

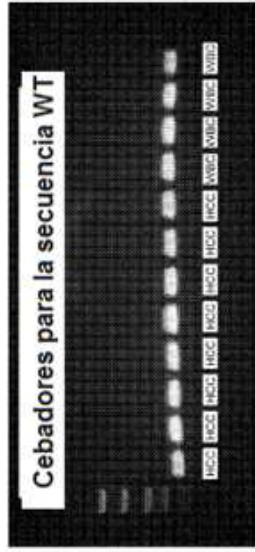


FIG. 12

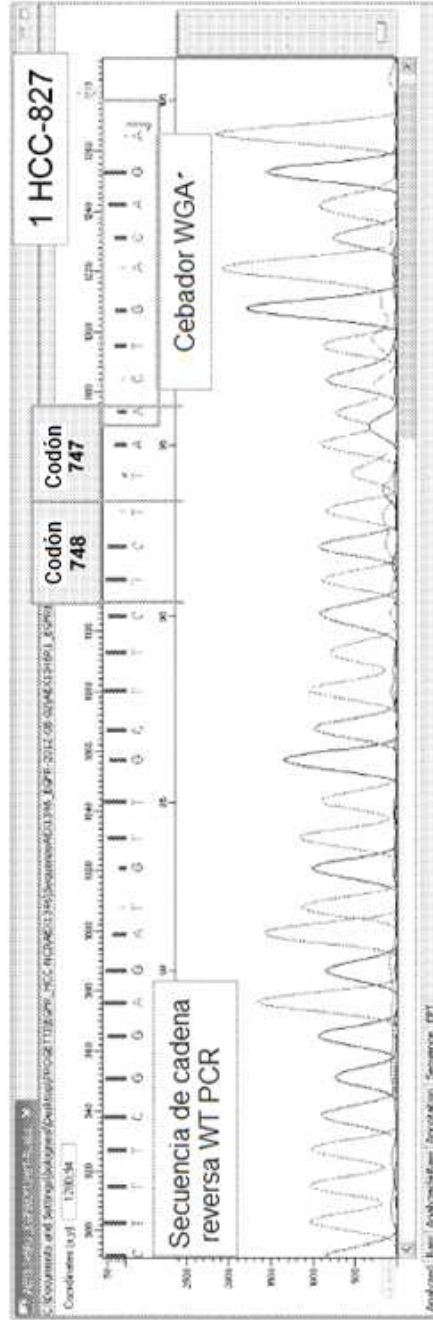


FIG. 13

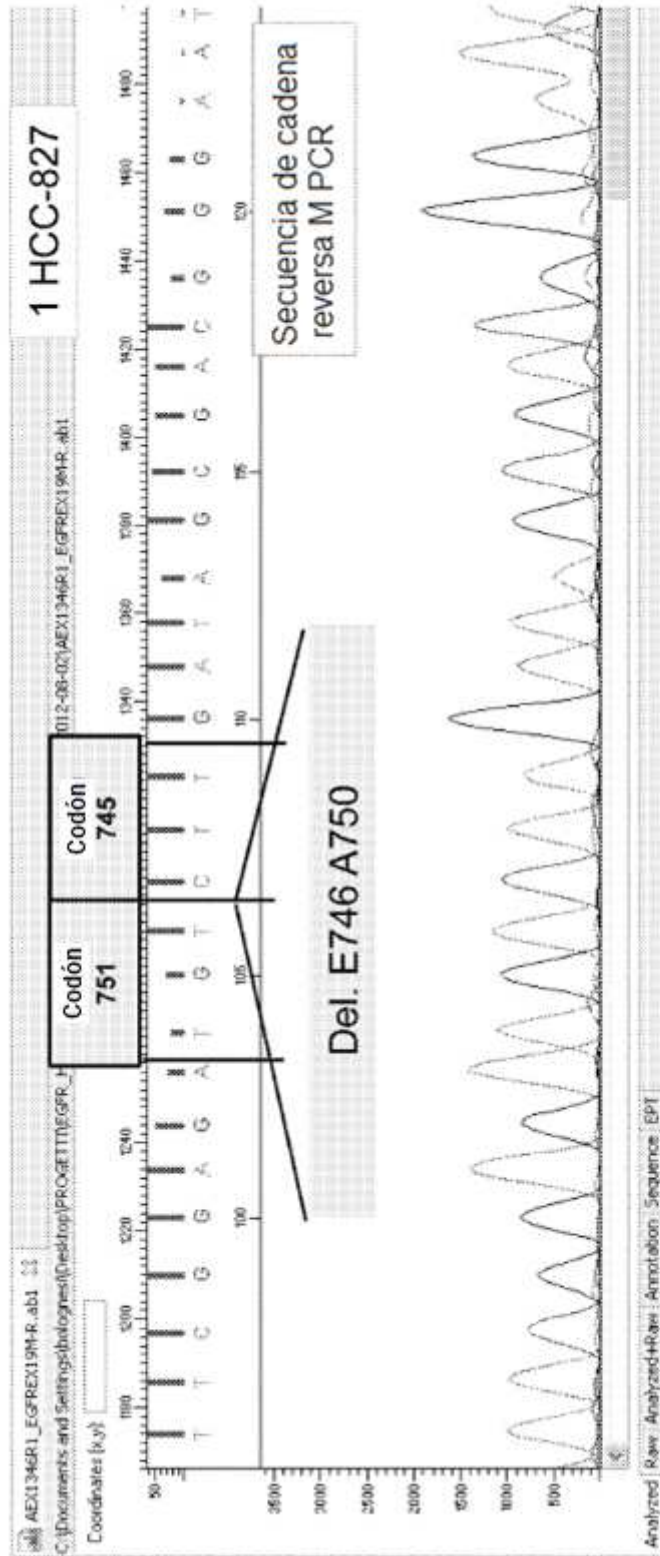


FIG. 14

ID de célula	Tipo de célula	# de célula	Fijación	EGFR Exón19 Del. E746_A750	
				WT	M
AEX1204R1	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R2	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R3	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R4	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R5	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R6	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R7	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R8	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R9	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1204R10	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R1	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R2	HCC-827	1	Veridex	0	1
AEX1171R3	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R4	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R5	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R6	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R7	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R8	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R9	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1171R10	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R1	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R2	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R3	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R4	HCC-827	1	Veridex	0	1
AEX1346R5	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R6	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R7	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R8	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R9	HCC-827	1	Veridex	1	1
AEX1346R10	HCC-827	1	Veridex	0	1
AEX1346R11	HCC-827	1	Veridex	1	1
AWG1162R1	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1162R2	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1162R3	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1162R5	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1162R6	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1162R7	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1162R8	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1205R1	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1205R2	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1205R3	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1205R4	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1205R5	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1205R6	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1205R7	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1205R8	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1205R9	PBMC	1	Vivo	1	0
AWG1205R10	PBMC	1	Vivo	1	0
AEX1204R11	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1204R12	PBMC	1	Veridex	1	1
AEX1204R13	PBMC	1	Veridex	1	1
AEX1171R11	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1171R12	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1171R13	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1171R14	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1171R15	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1346R14	PBMC	1	Veridex	1	0
AEX1346R15	PBMC	1	Veridex	1	1
AEX1346R16	PBMC	1	Veridex	1	0

FIG. 15

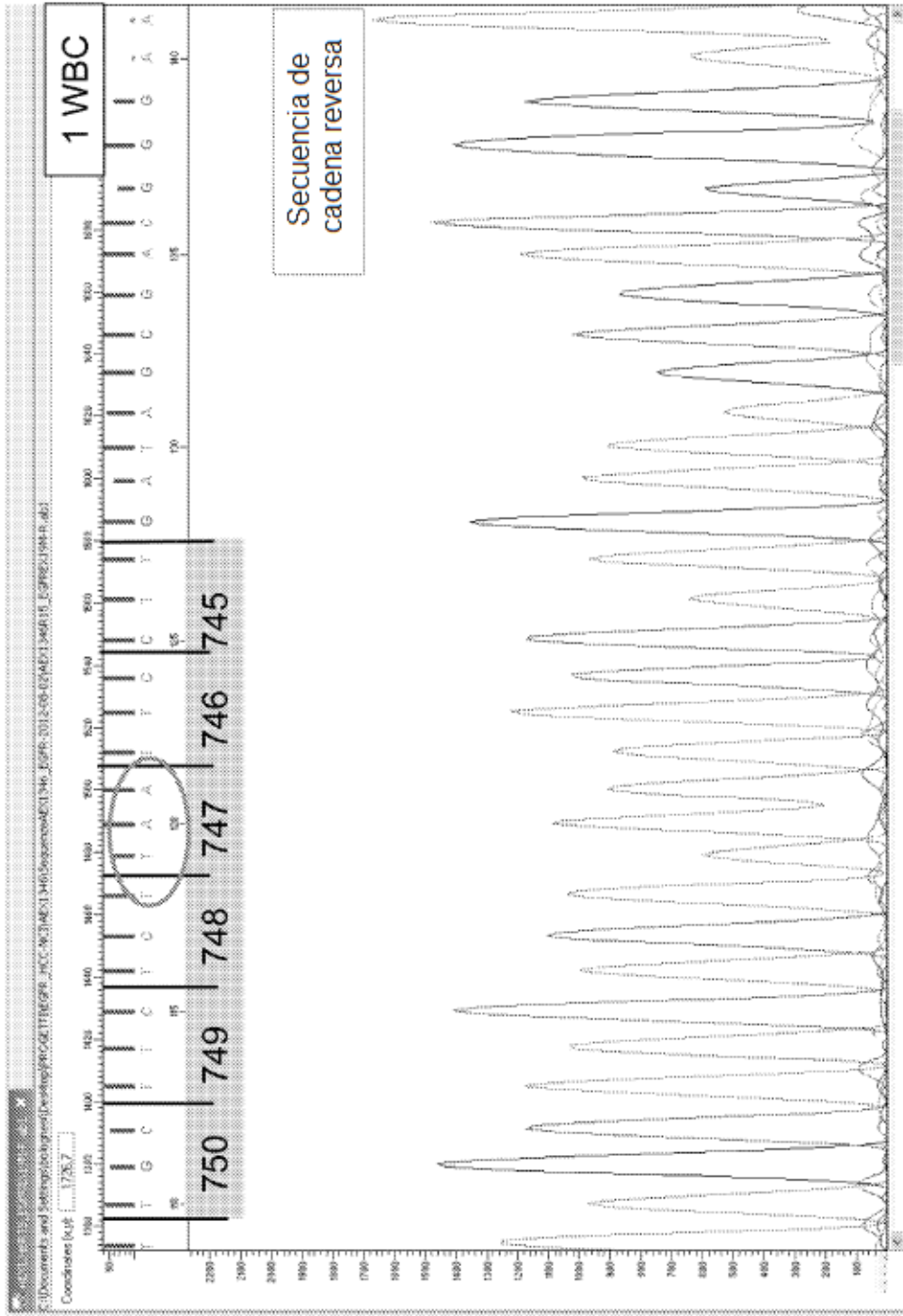


FIG. 16